



Моделирование регуляции развития меристемы побега в эмбриогенезе *Arabidopsis thaliana*

Научный руководитель:
к.б.н., доц. Лихошвай В. А.

Докладчик:
асп. ИЦиГ Акбердин И. Р.
3 год аспирантуры
Лаборатория теоретической генетики
Сектор молекулярной эволюции

Специальность:
03.00.28 – биоинформатика

Тема утверждена:
Учёный совет, протокол №11 от 07.05.08
Межлабораторный семинар, протокол №5 от 11.04.08

Объект исследования: *Arabidopsis thaliana*

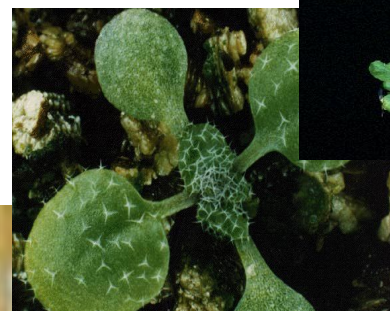


Arabidopsis thaliana

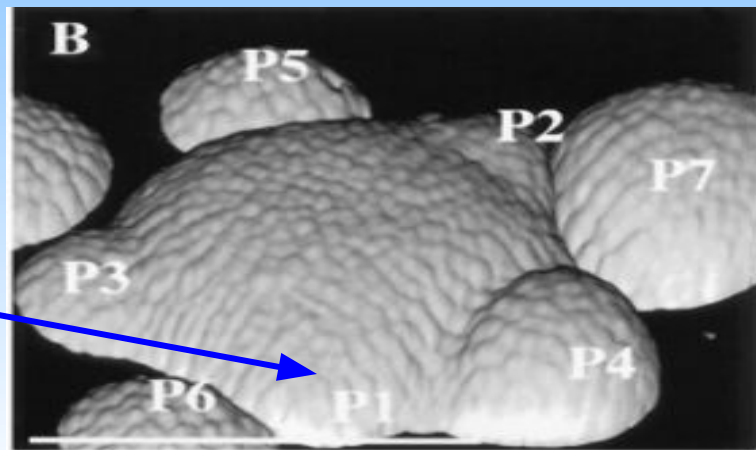
Преимущества Арабидопсиса, как модельного организма:

- 1) Один из самых маленьких известных геномов у высших растений (125 млн. пар оснований)
- 2) Всего 5 хромосом
- 3) Короткий жизненный цикл (~35 дней)
- 4) Большое количество семян (до 5000 на растение)
- 5) Неприхотлив, легко выращивается в лабораторных условиях, в том числе *in vitro*

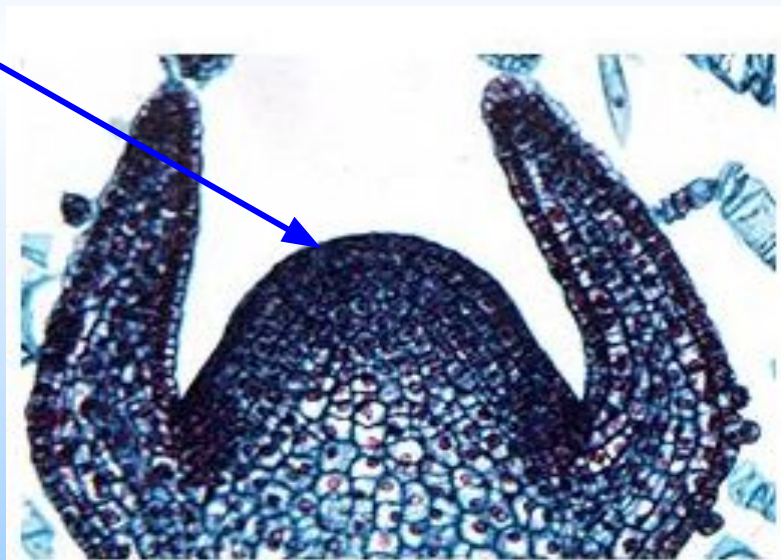
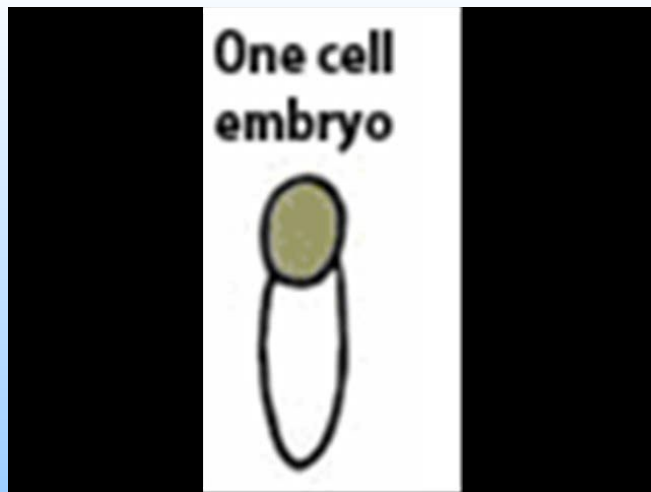
Arabidopsis был первым растением, геном которого был полностью секвенирован. Существует программа, по которой к 2010 году планируется определить функции всех генов этого растения.



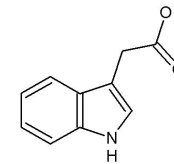
Меристема побега *Arabidopsis thaliana*:



Апикальная меристема побега (АМП)
с формирующимися листьями

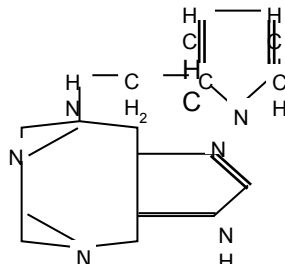


Основные гормоны, регулирующие рост и развитие растений:



1. **АУКСИН** — основной гормон растений, который регулирует деление клеток и является фактором дифференцировки - Индолилуксусная кислота (ИУК или гетероауксин).
2. **Цитокинин** - растительный гормон, производный 6-аминопурина; Основной природный цитокинин - зеатин (его синтетический аналог - кинетин); отвечает за поддержание тотипотентности

6-фурфуриламинопурин



Сверхзадача информационной биологии в области исследований данного объекта: Разработка методов и компьютерного обеспечения, позволяющего воспроизвести развитие данного организма *in silico*



Цель и задачи исследования:

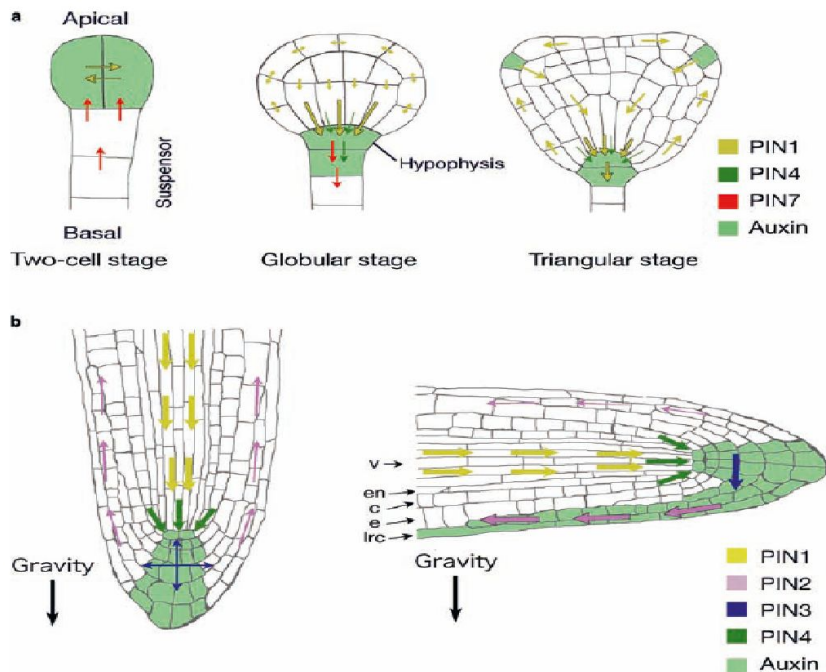
Цель:

Теоретический анализ регуляторных механизмов поддержания тотипотентности и дифференцировки клеток при развитии меристемы побега *Arabidopsis thaliana*

Задачи:

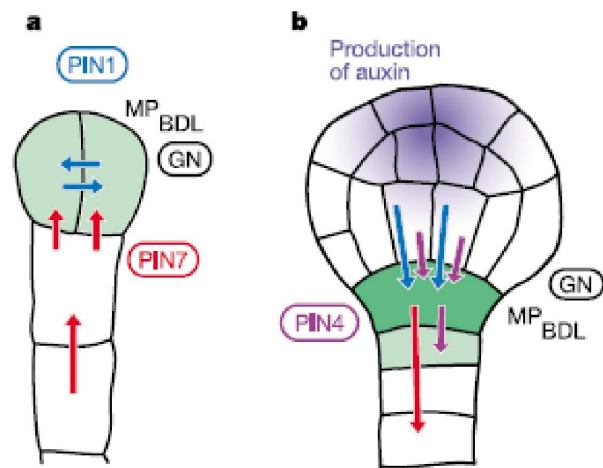
- Разработка методов и программного обеспечения для реконструкции и моделирования регуляторных контуров генных сетей;
- Реконструкция генной сети метаболизма ауксина – регулятора поддержания тотипотентности и дифференцировки клеток при развитии меристемы побега;
- Разработка математической модели внутриклеточного метаболизма ауксина с учетом генетической регуляции;
- Разработка пространственно – распределённой модели с учётом транспорта основных регуляторов, контролирующих развитие меристемы побега;
- Анализ разработанных моделей и их биологическая интерпретация.

Накопление и транспорт ауксина:



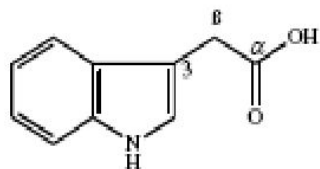
Паттерны распределения и накопления ауксина в побеге и корне;

Зеленым обозначены места накопления ауксина

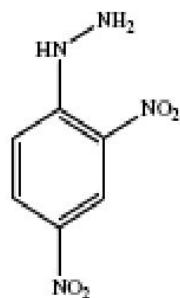


Модель роли ауксина в эмбриогенезе; Зеленым цветом обозначены места накопления ауксина и ауксинового ответа. Ауксин накапливается в проэмбрионе за счёт PIN7 системы, осуществляя спецификацию апикальную части растения; затем свободная форма ауксина начинает нарабатываться в апексе и транспортироваться обратно.

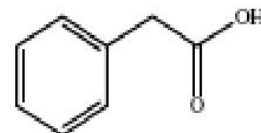
Химические структуры веществ, обладающих активностью ауксина:



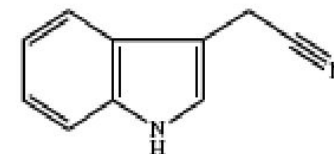
indole-3-acetic acid (IAA) FW=176



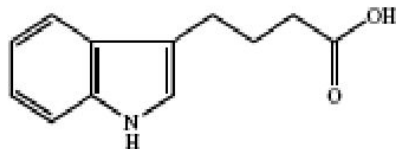
2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-D) FW=198



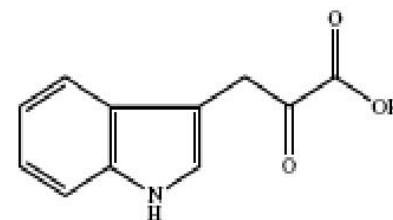
phenylacetic acid (PAA) FW=136



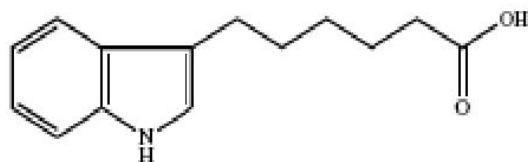
indole-3-acetonitrile (IAN) FW=156



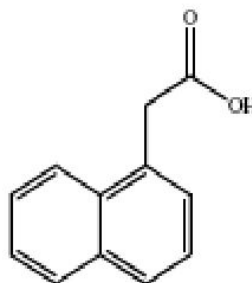
indole-3-butyric acid (IBA) FW=204



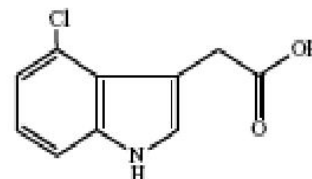
Indole-3-Pyruvic Acid (IPA) FW=203



indole-3-caproic acid (ICA) FW=232

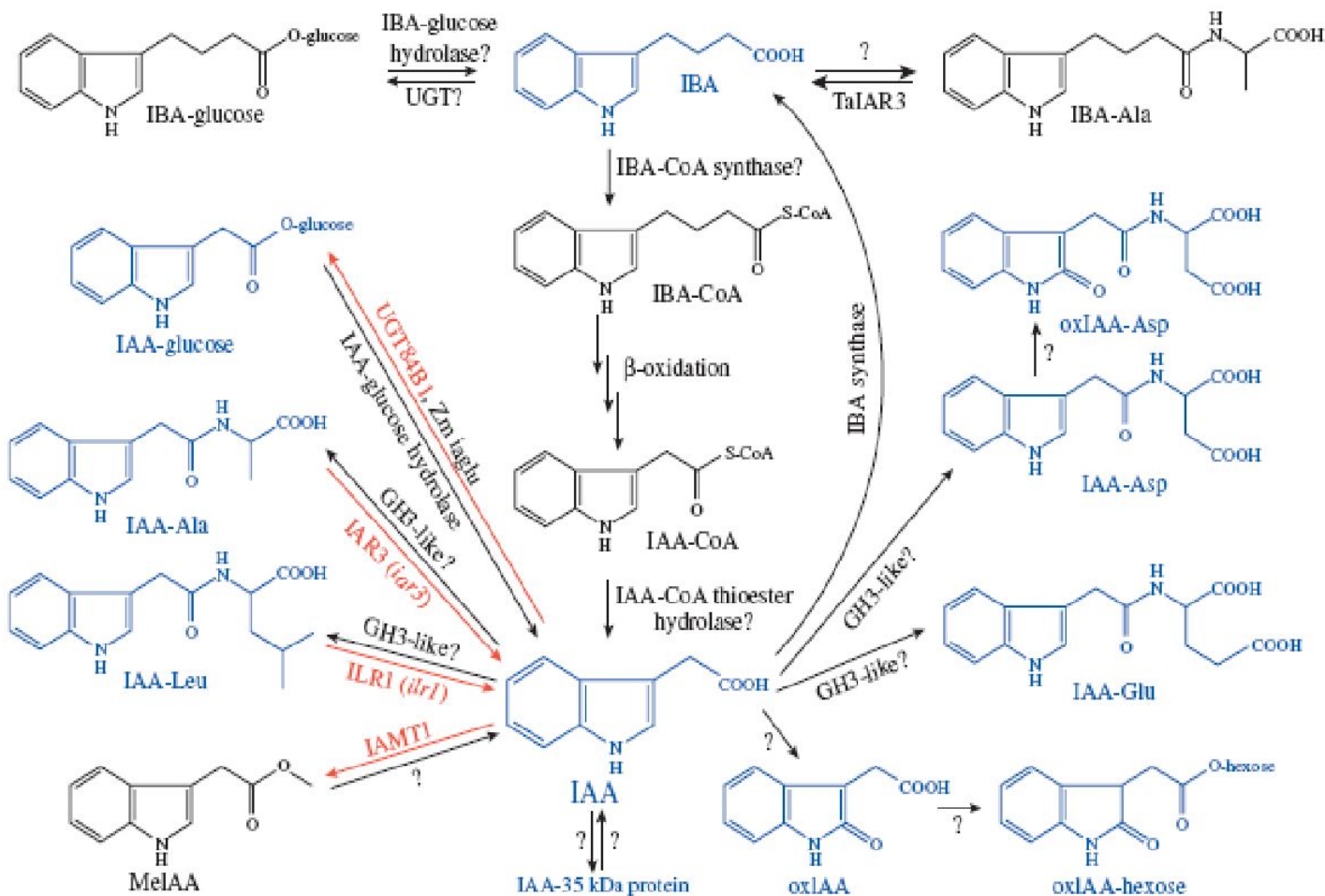


Naphthalene acetic acid (NAA) FW=186



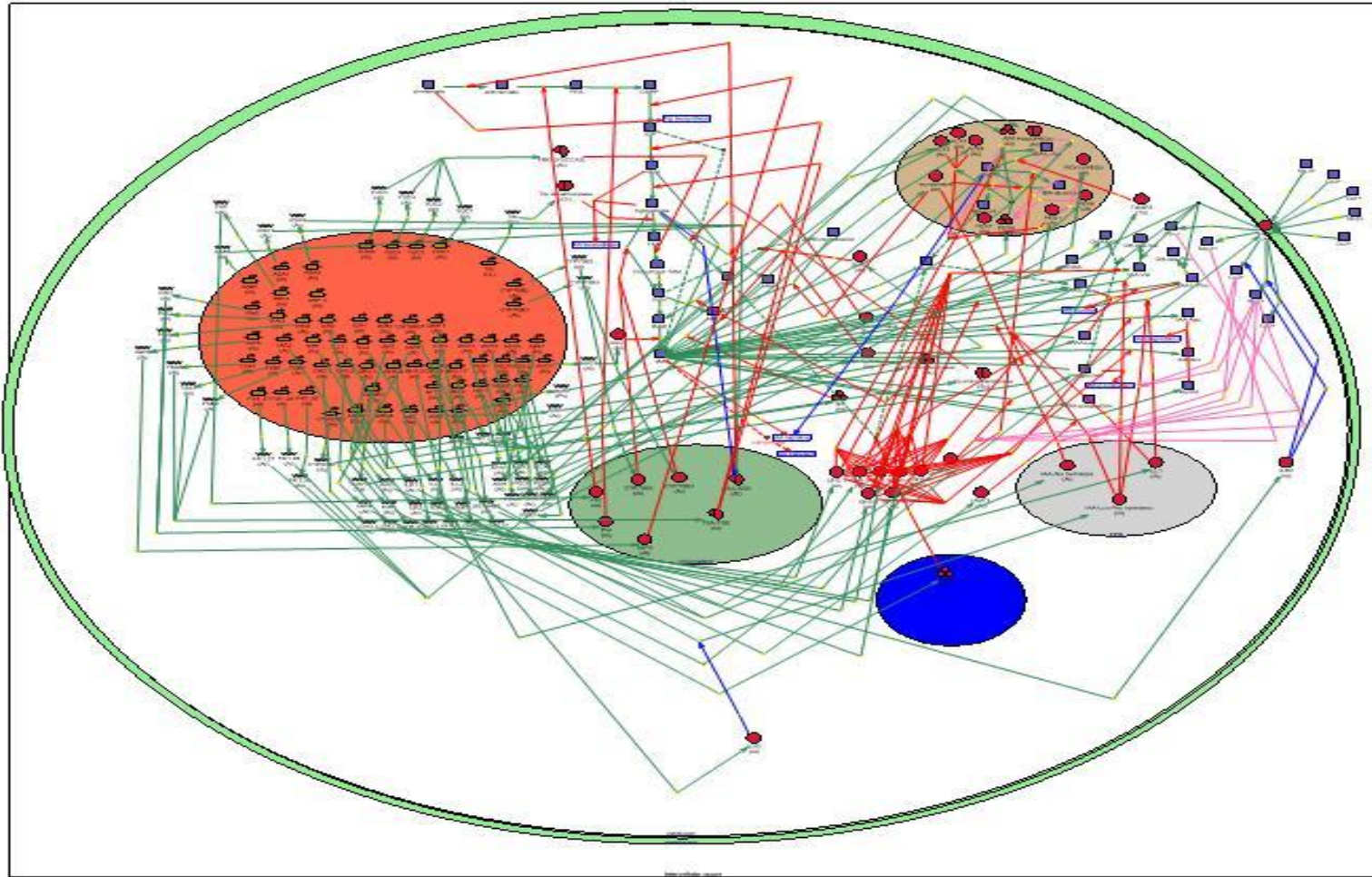
4-Cl-indole-3-acetic acid (4-Cl-IAA) FW=210

Конъюгация ауксина:



Потенциальные пути метаболизма ауксина в клетке Арабидопсиса.

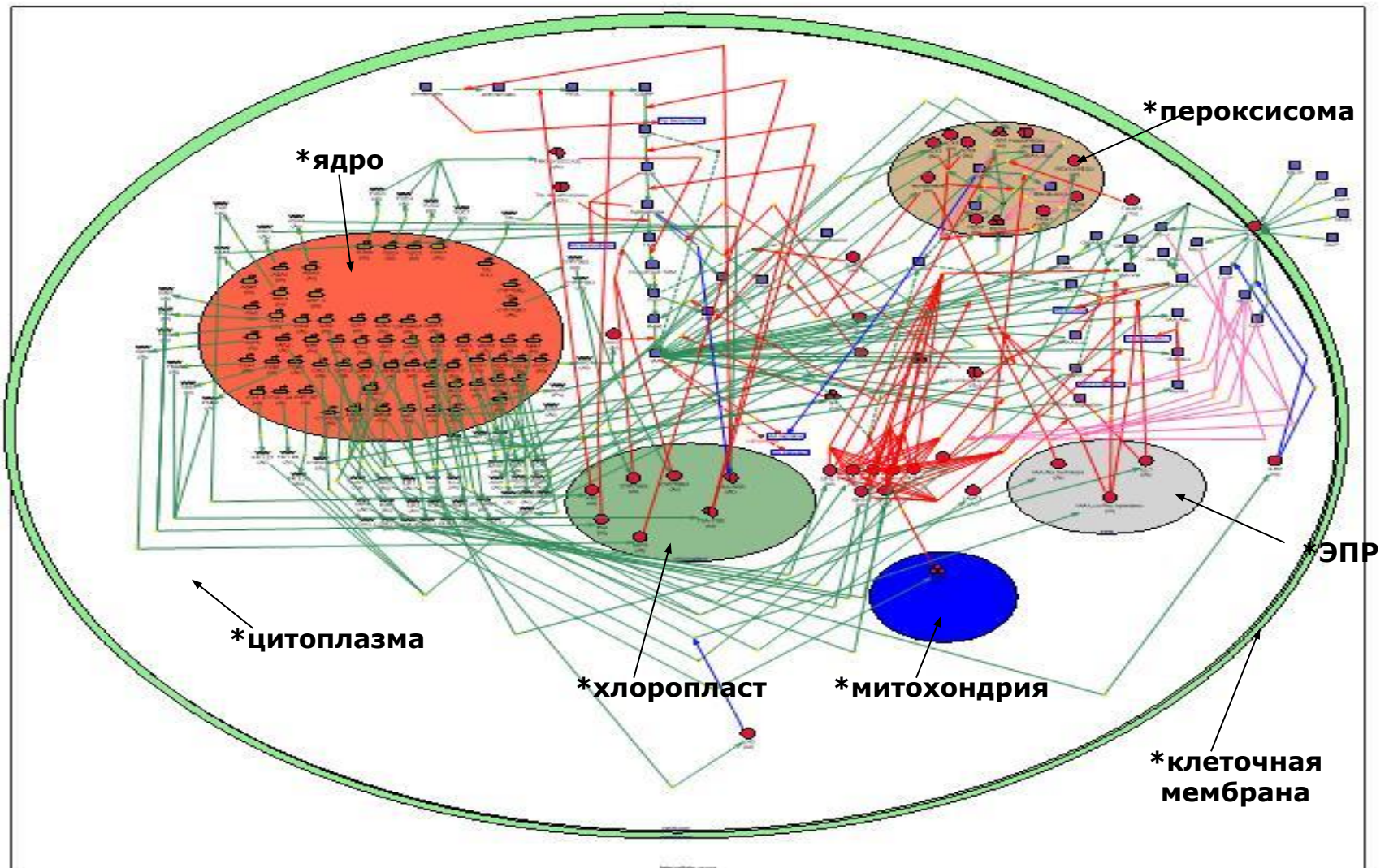
Структурная модель генной сети метаболизма ауксина*:



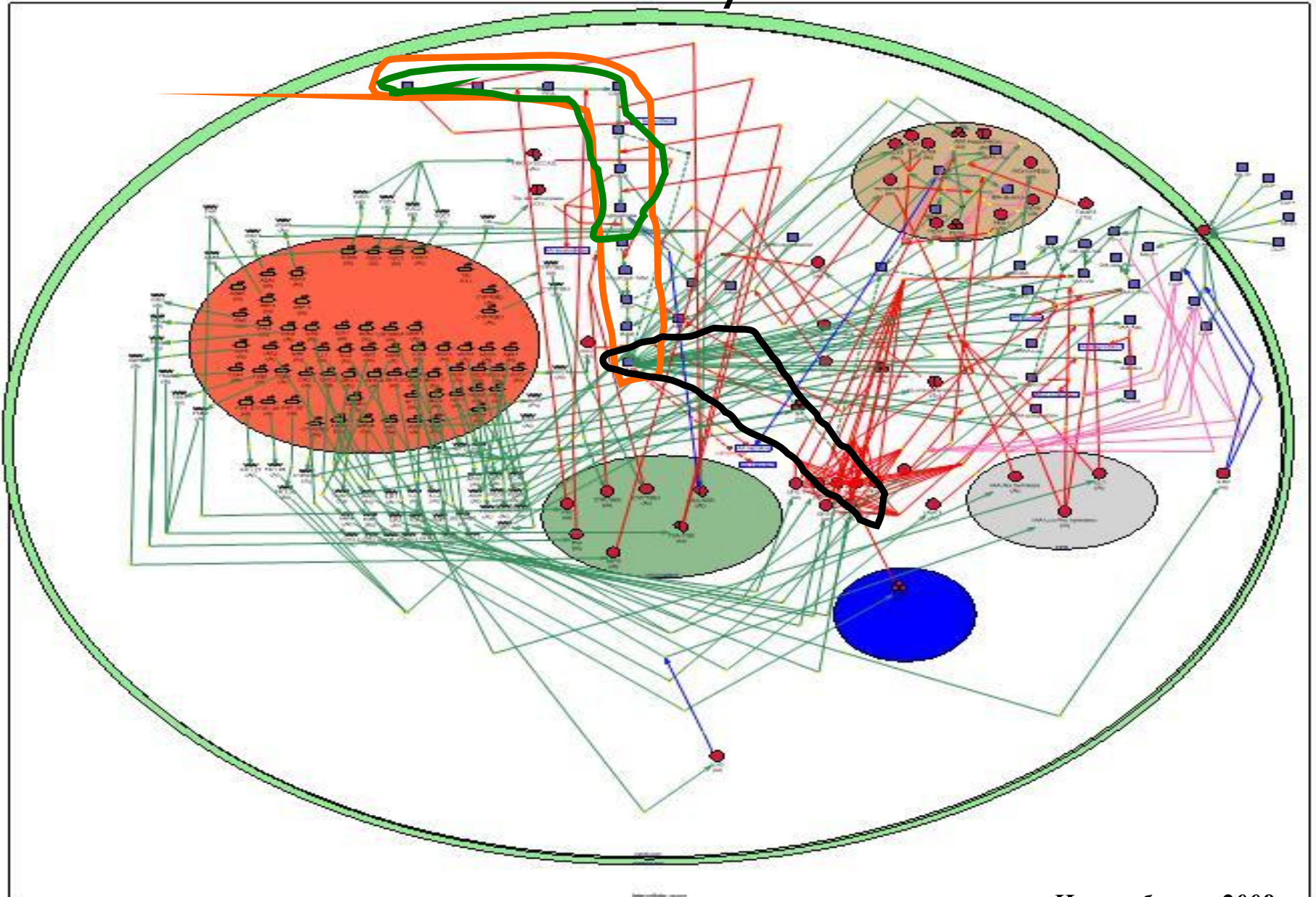
*-Ananko et al., 2005

Новосибирск, 2008

Структурная модель генной сети метаболизма ауксина:



Структурная модель генной сети метаболизма ауксина:





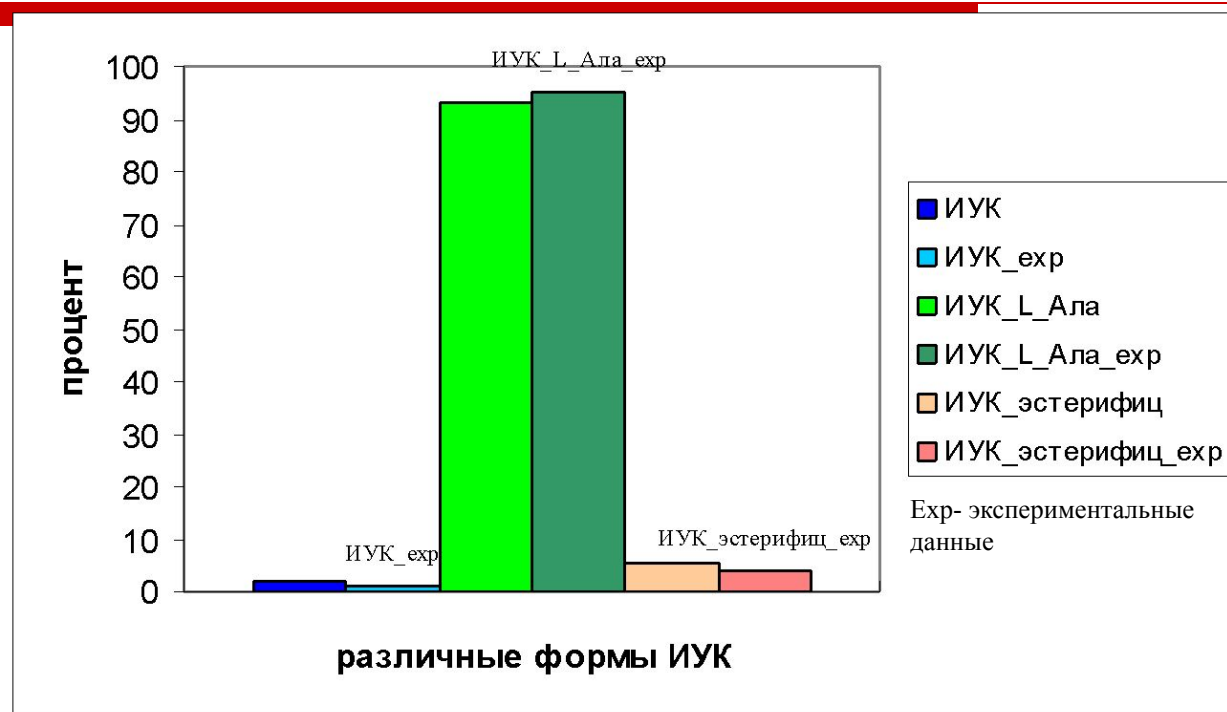
MGSmodeller: Компьютерная система для конструирования, расчета и анализа моделей молекулярно-генетических систем:

The screenshot displays the MGSmodeller software interface. On the left, a 'Проекты' (Projects) tree shows a project named 'mine' containing sub-projects like 'Auxin' and 'Auxin04_06'. The main window is titled 'Auxin04_06_res04_06_Vkinetics.rst' and features a line graph with multiple colored lines representing different components over time. To the right of the graph is a legend with a 'name' column and corresponding colored squares. Below the graph, a code editor window titled 'Auxin04_06_mMod.mod' shows the following code:

```
/* block nomer= 1
(bb) <B(GIR),J(1),F(DIFSUB)>.
(pp) <I(_END_NPPP)>.
(ee) <E#(TRIV)>.
(cc) <I(gir)>.
1.0000000000000000
(ee) <E(++++)>. block_end

/* block nomer= 2
(bb) <B(GIR_POINT),J(3)>.
```

Результаты моделирования процентного содержания различных форм ауксина в клетке меристемы побега:



Расчёты модели:

Процентное содержание различных форм ауксина (ИУК) в клетке:

По оси y-проценты

По оси x-форма ИУК

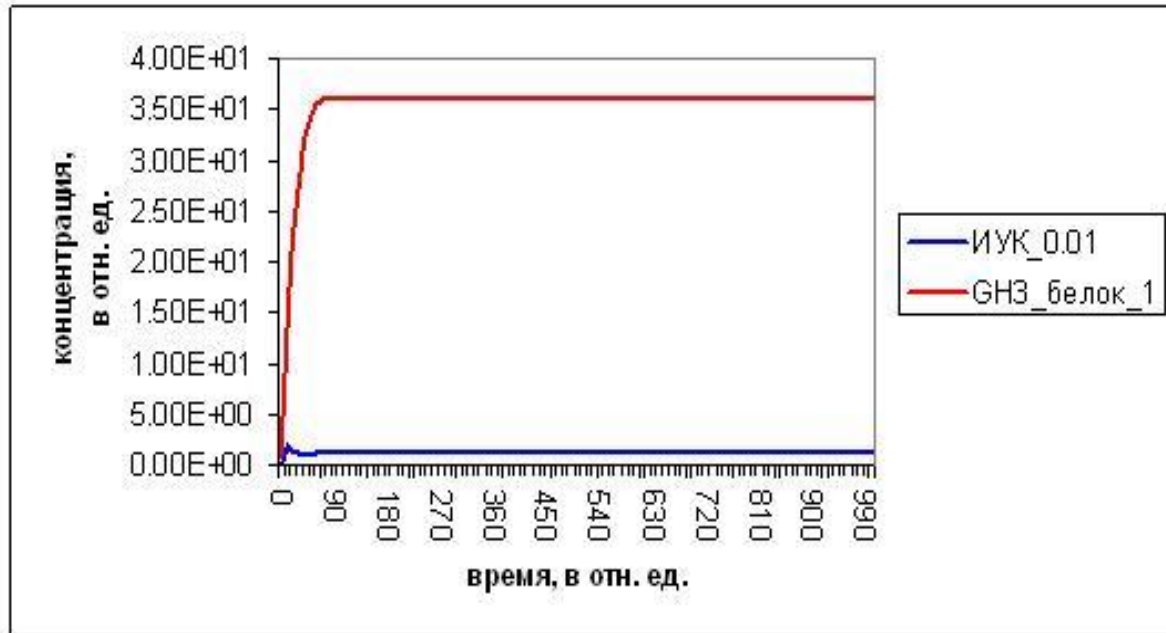
Экр- экспериментальные данные

В клетках побега Арабидопсиса, свободная форма ауксина и его эстерифицированная форма составляют только <1% и 4% от общего пула ауксина, соответственно. Оставшийся пул ауксина (95%) составляют амидные формы ауксина (Park et al., 2001).

Karin Ljung, 2002

Новосибирск, 2008

Результаты моделирования динамики изменения концентрации ИУК и GH3 белка в клетке в зависимости от начальной концентрации:



Расчёты модели:

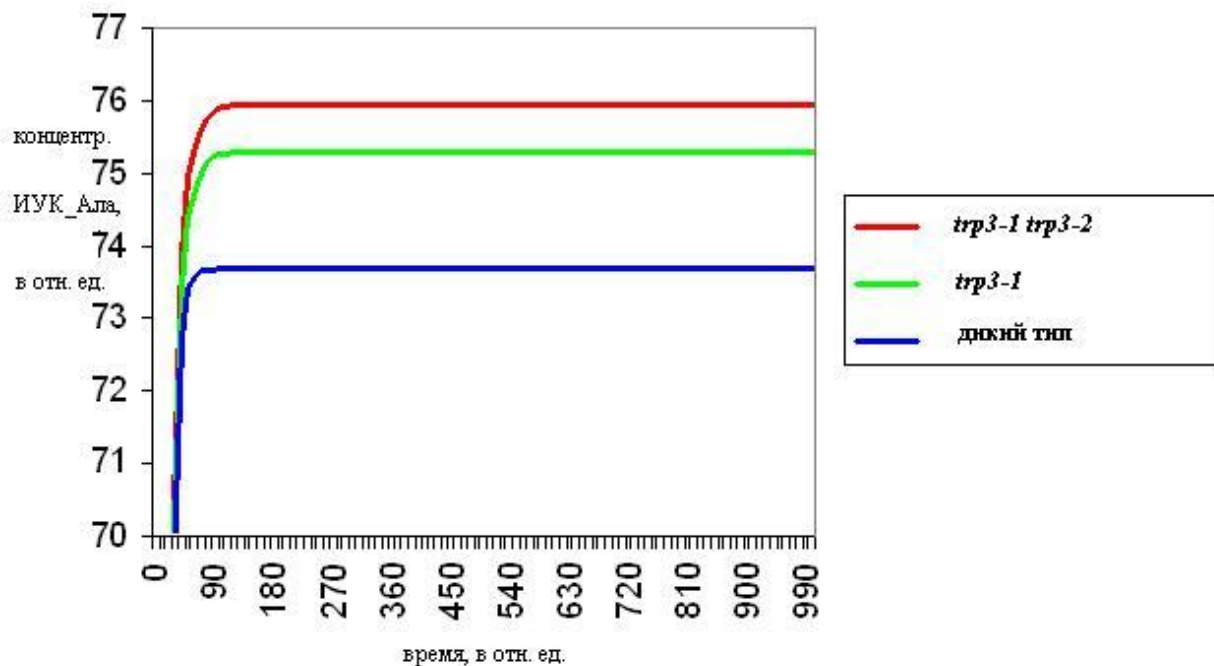
Концентрация ИУК и GH3 белка в клетке в зависимости от начальной концентрации:

По оси y-концентрация ИУК и GH3 белка

По оси x-время расчёта

Ферменты, которые осуществляют реакции конъюгации ИУК с аминокислотами, кодируются белками семейства GH3, которые кодируются ауксин индуцируемыми генами. Эти ферменты входят в суперсемейство люцифераз (Staswick et al., 2002). Также известно, что ауксин быстро и мимолётно индуцирует накопление, по крайней мере, трёх семейств транскриптов: SMALL AUXIN-UP RNAs (SAURs), GH3-связанные транскрипты и члены семейства AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA).

Результаты моделирования динамики изменения концентрации ИУК-аланин в норме и при мутациях (*trp2, trp3*):



Расчёты модели качественно совпадают с экспериментальным и данными:

Концентрация конъюгата ИУК-аланин в клетке в норме и при мутациях (*trp2, trp3*):

По оси y-концентрация ИУК-аланин

По оси x-время расчёта

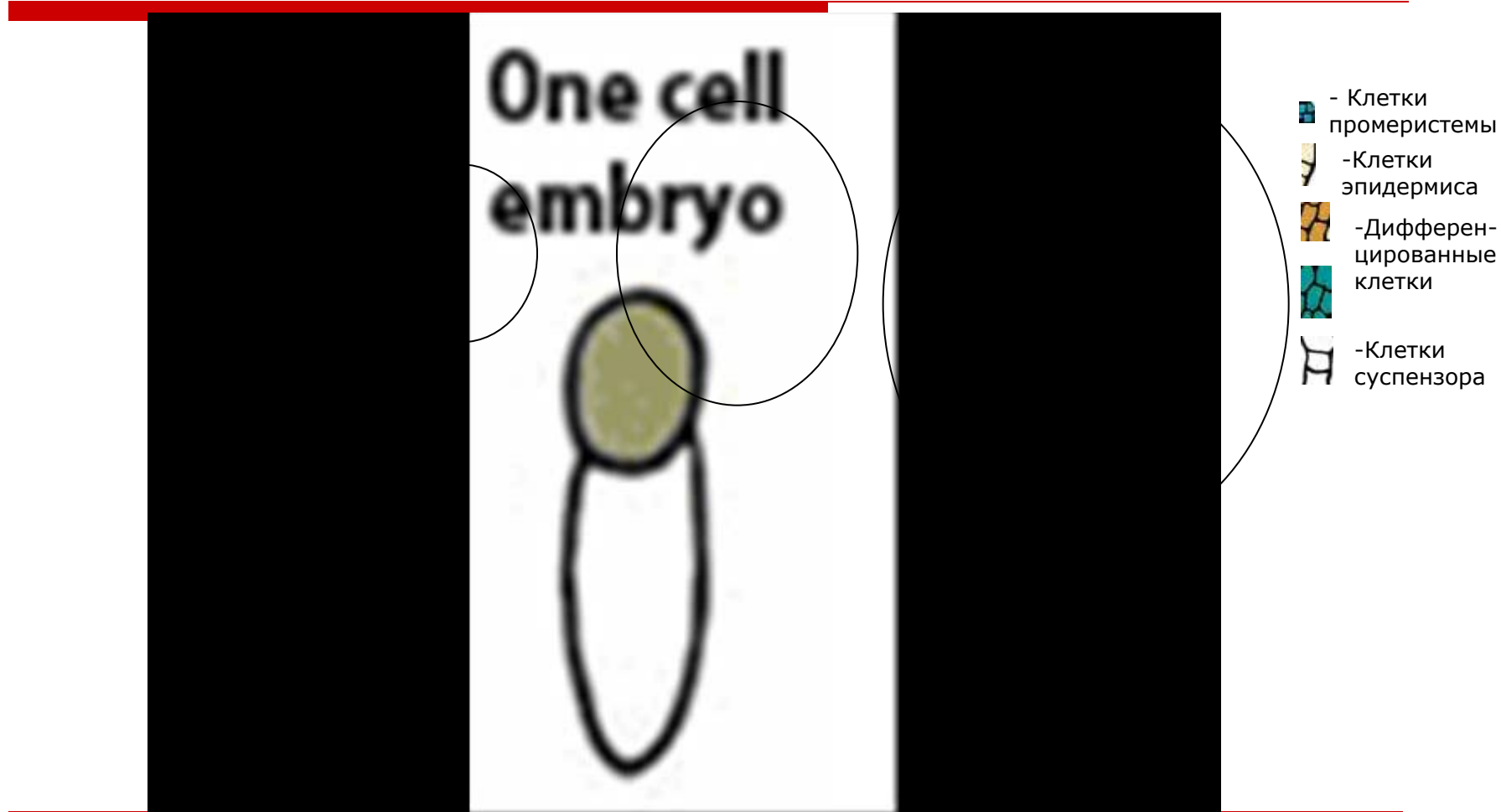
Мутанты арабидопсиса *trp3-1* и *trp2-1* имеют нарушения в Trp синтазах a and b, соответственно (Last et al., 1991; Radwanski et al., 1996). Мутанты данных типов накапливают содержание амидных форм ауксина (Normanly et al., 1993; Ouyang et al., 2000), несмотря на низкий уровень триптофана (Muller and Weiler, 2000a; Ouyang et al., 2000)...в кукурузе, однако, Trp синтаза a может действовать без b субъединицы для того, чтобы производить индол, который преобразуется в определённые «защитные» вещества (Frey et al., 1997, 2000; Melanson et al., 1997) или, возможно, в ауксин.

* - A.W. Woodward and B.Bartel. Auxin: Regulation, Action, and Interaction.

Annals of Botany, 95: 707–735, 2005

Новосибирск, 2008

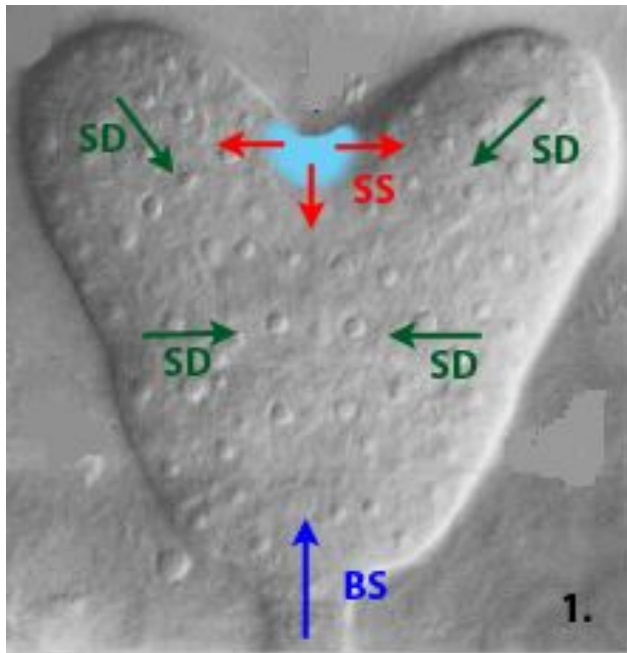
Эмбриональное развитие меристемы побега *Arabidopsis Thaliana*



Разработка пространственно – распределённой модели:

Основные принципы:

- Клетки автомата могут обмениваться химическими сигналами. Было выбрана 3 типа сигналов имеющих биологический смысл:
 - стволовой сигнал (SS);
 - сигнал дифференцировки (SD);
 - базальный сигнал (BS);
- Все клетки разделены на несколько типов в зависимости от типа продуцируемого ими сигнала, причем клетки могут менять свой тип;
- Тип клетки и продолжительность клеточного цикла зависят от локальной концентрации сигналов;
- Направления деления зависят от градиентов распределения сигналов.



*Сердцевидная
стадия развития
меристемы побега*

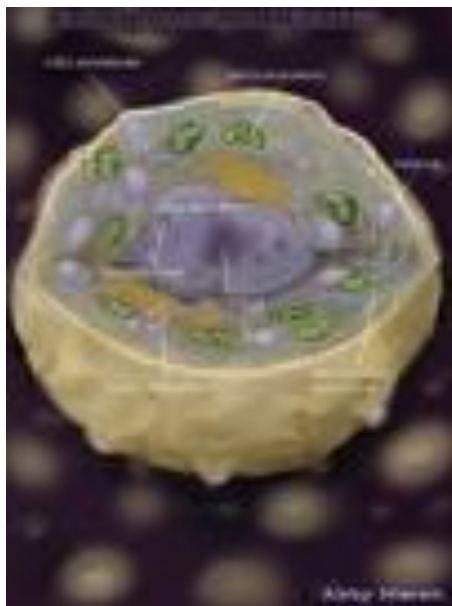
(Friml et al., 2003)



Типы клеток автомата:

- **Промеристем** - клетки меристемы зародыша. Эти клетки продуцируют SS и находятся в верхней части зародыша. В процессе развития эти клетки переходят в клетки типа Л2меристемы и Л3меристем.
- **Л2меристем** - клетки меристемы, находящиеся во втором слое (считая от эпидермального слоя) верхней части зародыша. Эти клетки продуцируют SS.
- **Л3меристем** - клетки, находящиеся на слой ниже клеток типа Л2меристем. Так же продуцируют SS.
- **Транзитные** - клетки, находящиеся вблизи меристемы. Они так же продуцируют низкий SD, но имеют самый высокий темп деления.
- **Латеральные** - клетки этого типа имитируют «дифференцированные» клетки, которые продуцируют SD.
- **Суспензорные** - клетки суспензора. Эти клетки продуцируют BS и располагаются в нижней части зародыша. В модели их всегда две.

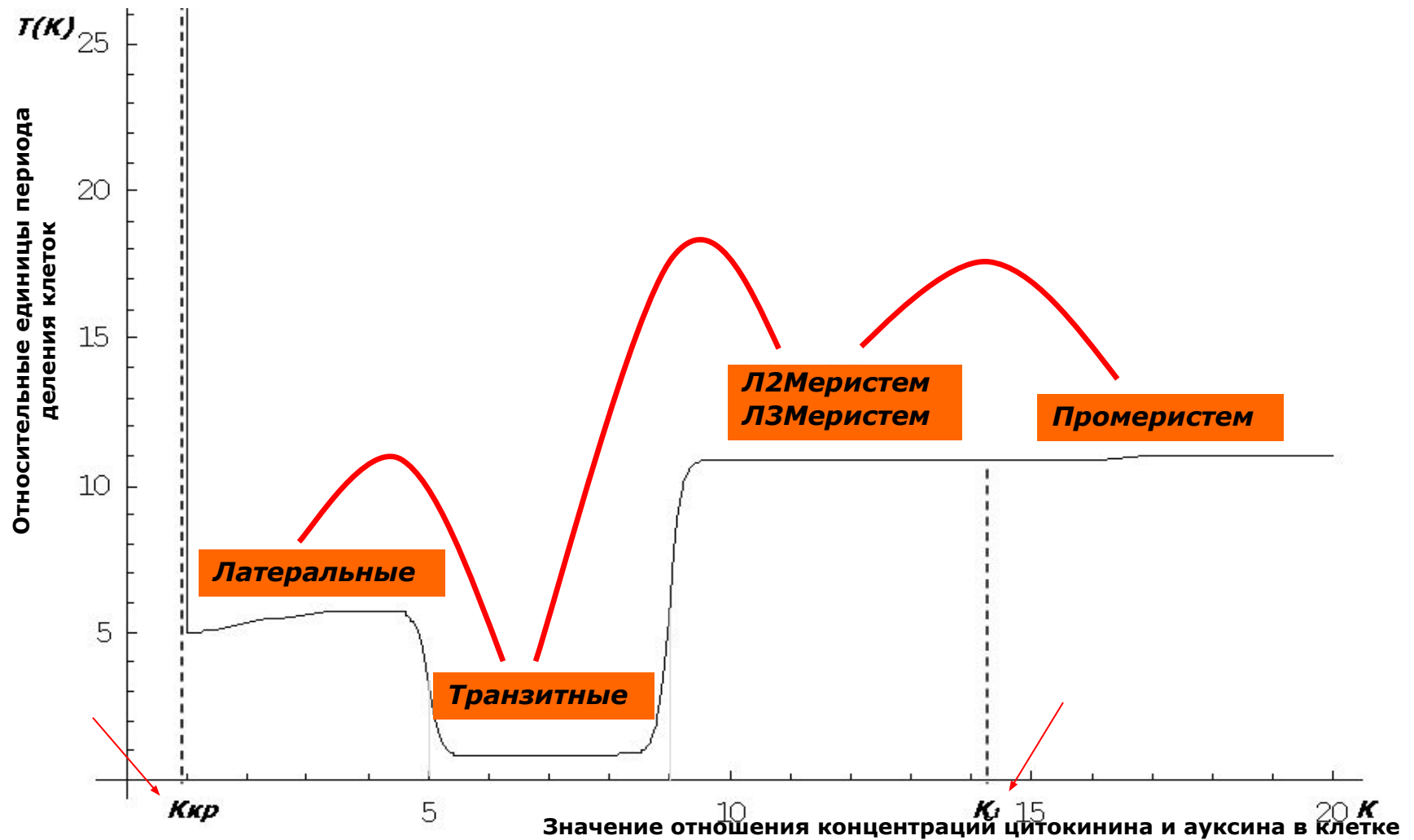
Внутренние параметры «клетки» модели:



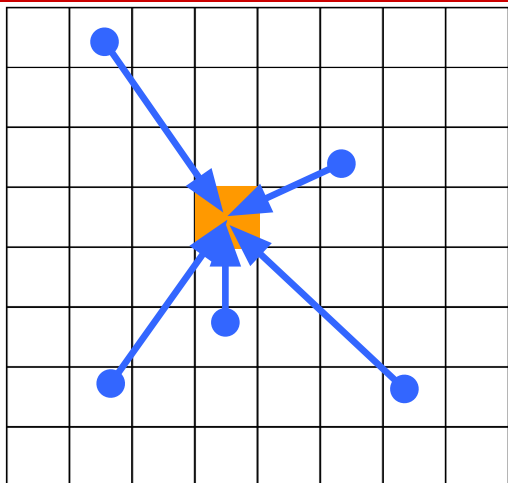
- *Type* – тип клетки
- *BS0, SS0, SD0* – значения сигналов продуцируемых данной клеткой.
- *BS, SS, SD* – значения сигналов с учетом влияния всей ткани.
- *K* – отношение стволового сигнала к сигналу дифференцировки, $K=SS/SD$.
- *T* – продолжительность клеточного цикла, $T=T(K)$.
- *Tr* – возраст клетки считая от последнего деления.



Темпы делений клеток меристемы побега:



Взаимодействие «клеток» модели:



$$BS_{ij} = \alpha_{ij}^B \sum BS0_{km} e^{-\frac{n}{R_B}}$$

$$SS_{ij} = \alpha_{ij}^S \sum SS0_{km} e^{-\frac{n}{R_S}}$$

$$SD_{ij} = \alpha_{ij}^D \sum SD0_{km} e^{-\frac{n}{R_D}}$$

$$n = |i - k| + |j - m|$$

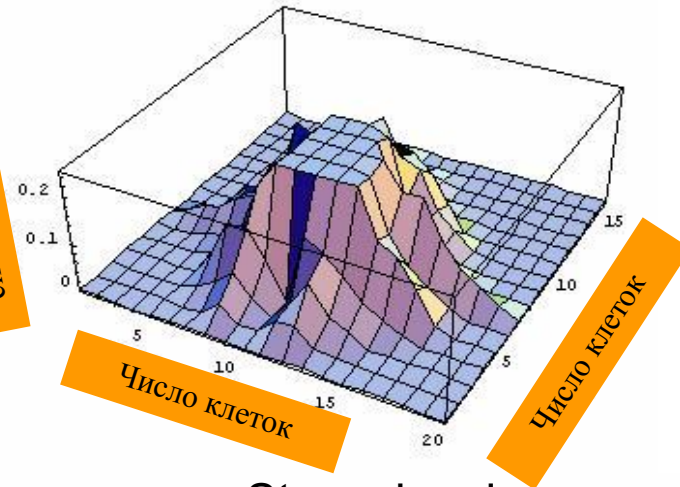
□ Глобальное взаимодействие

Суммарное влияние на клетку с координатой (i, j) есть сумма продуцируемых сигналов по всем клеткам ткани с весами экспоненциально убывающими от расстояния между клетками.

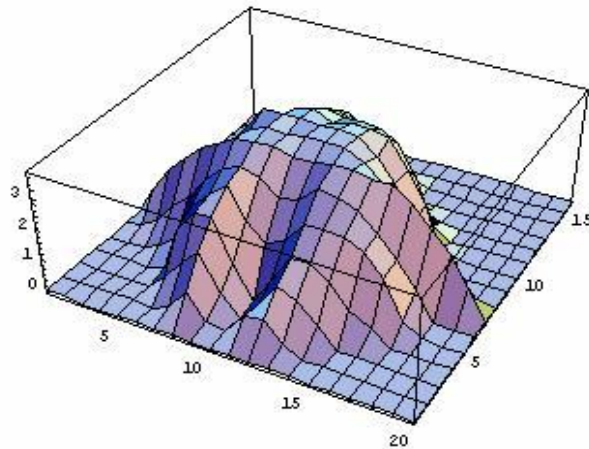


Визуализация модели клеточного автомата:

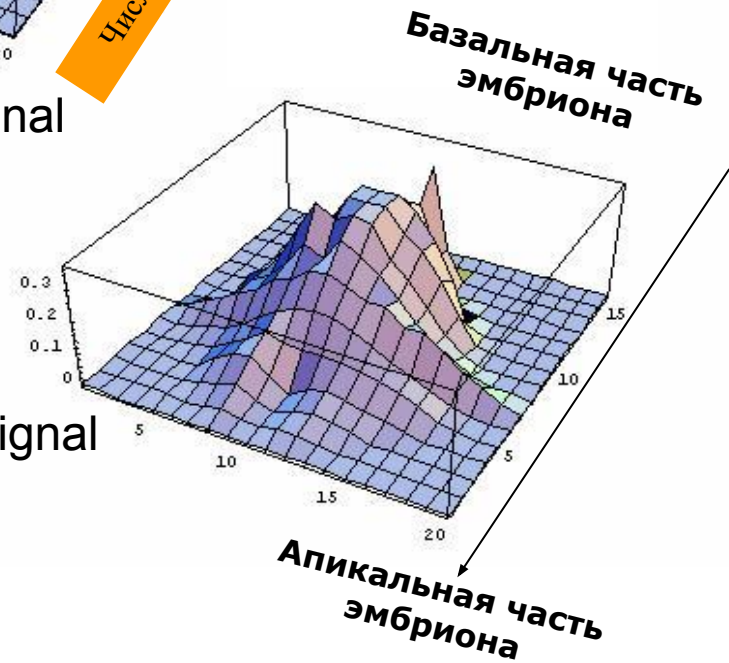
Случайные
единицы
концентрации
сигнала в клетке



Stem signal

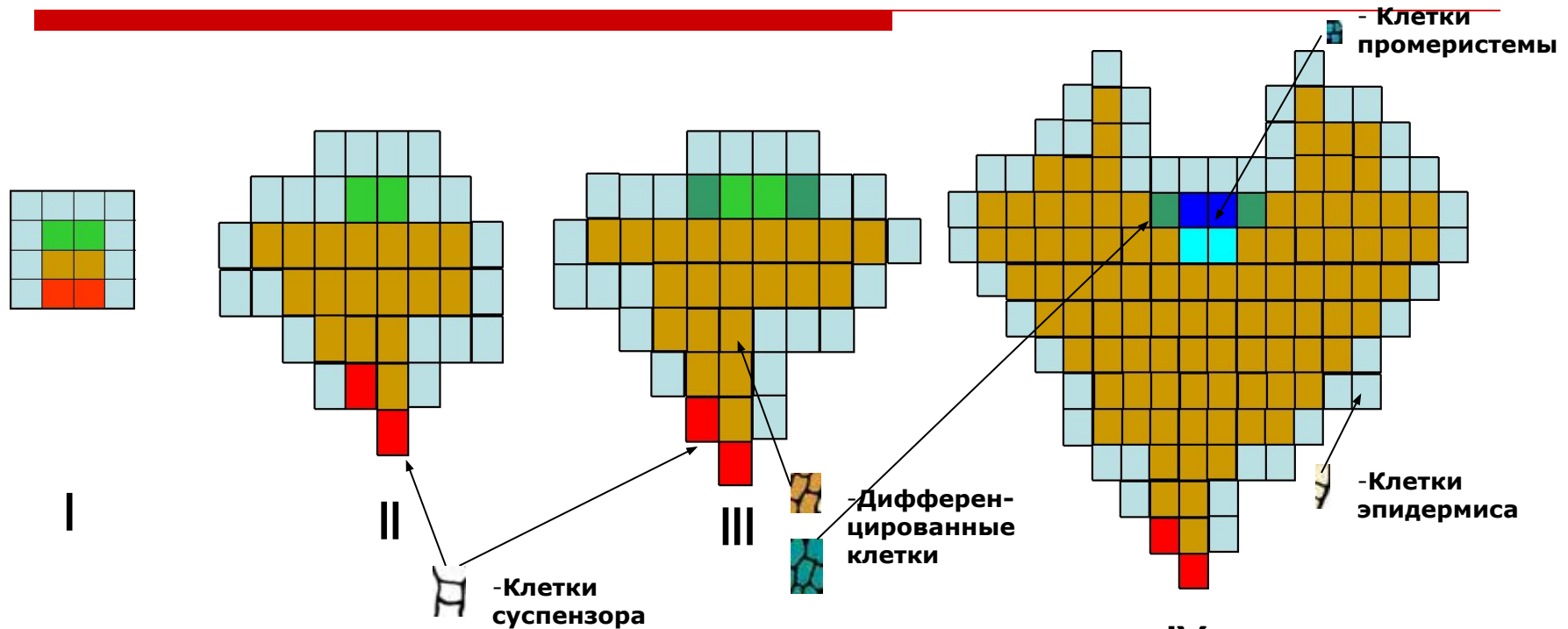


Differentiation signal



Basal signal

Результаты моделирования. Нормальное развитие зародыша:



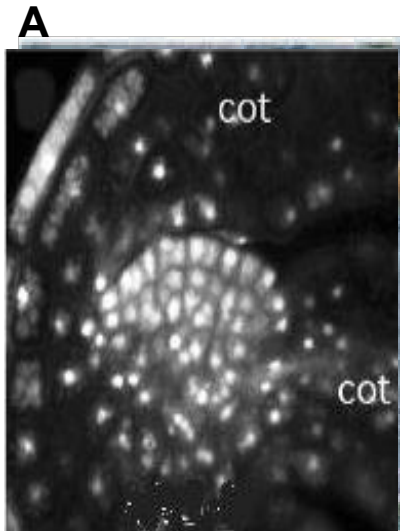
I-16 клеточный эмбрион (■ - Эпид., ■ - Промеристем, ■ - Латерал., ■ - Суспенз.); II-глобулярная стадия (нет новых клеточных типов), III-сердечковидная стадия (■ - Транз.), IV-торпедная стадия (■ -Л2Меристем, ■ - Л3Меристем);

Результаты моделирования. Мутантное развитие зародыша:

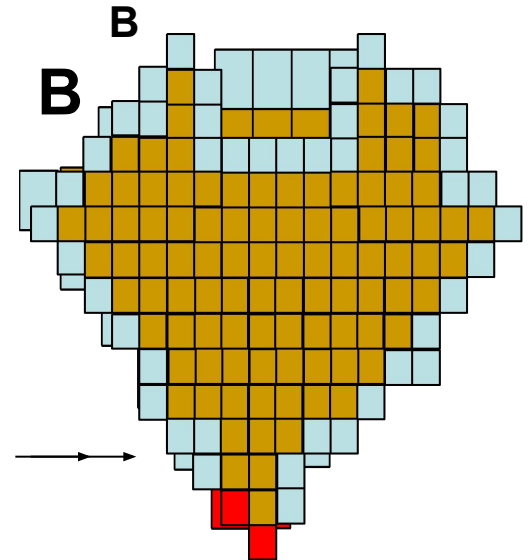
мутация I вида:

Модель: чувствительность Promeristem к Signal of Differentiation (больше), чувствительность L2, L3 к Stem Signal (меньше)

Организм: *clv3-2 cuc1 cuc2*



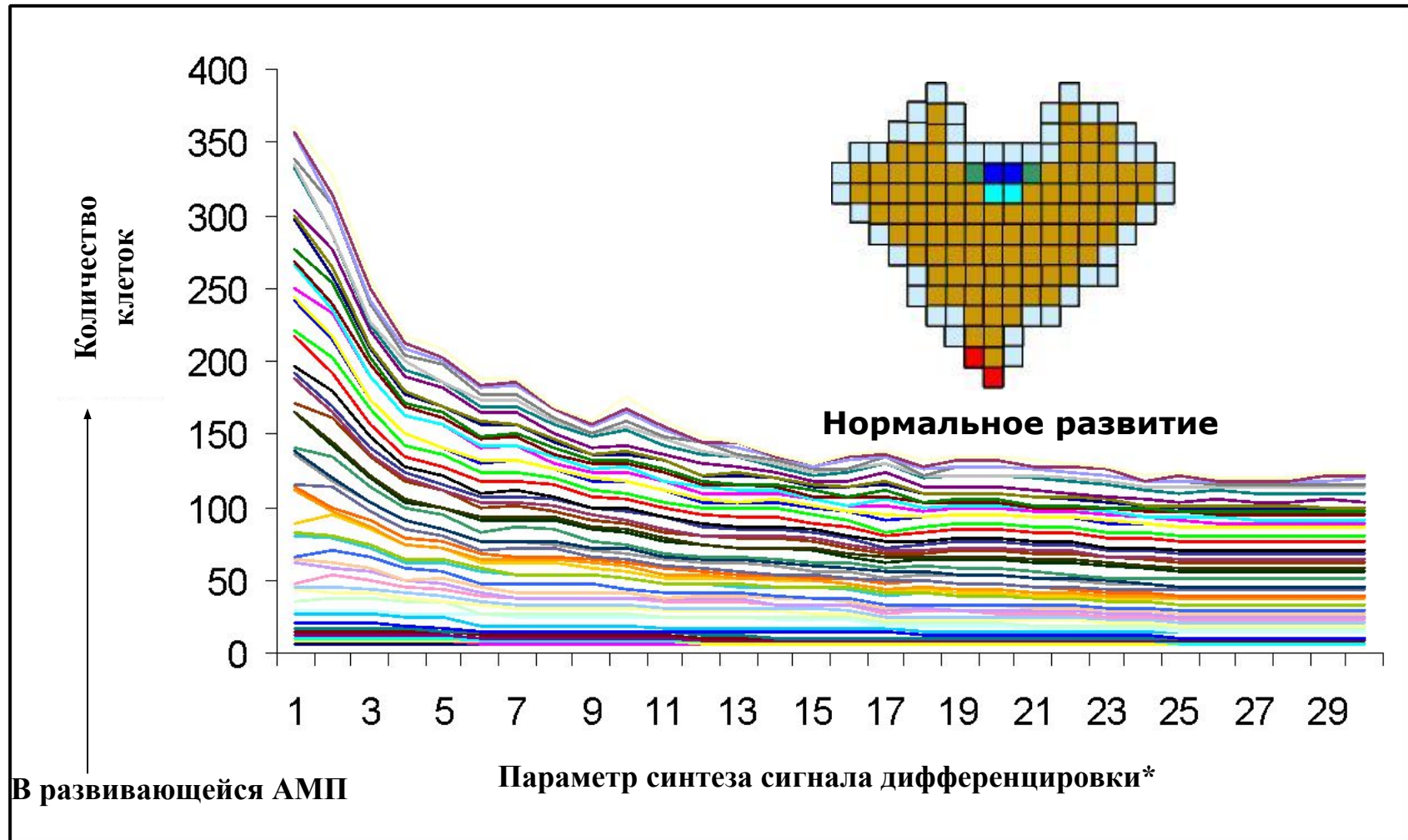
← Из эксперимента
← Из эксперимента



I-16 клеточный эмбрион (- Эпид., - Промеристем, - Латерал., - Суспенз.); II-глобулярная стадия (нет новых клеточных типов), III-сердечковидная стадия (- Транз.), IV-торпедная стадия (- L2 Меристем, - L3 Меристем);



Анализ чувствительности модели к параметрам транспорта и синтеза SD (сигнала дифференцировки):

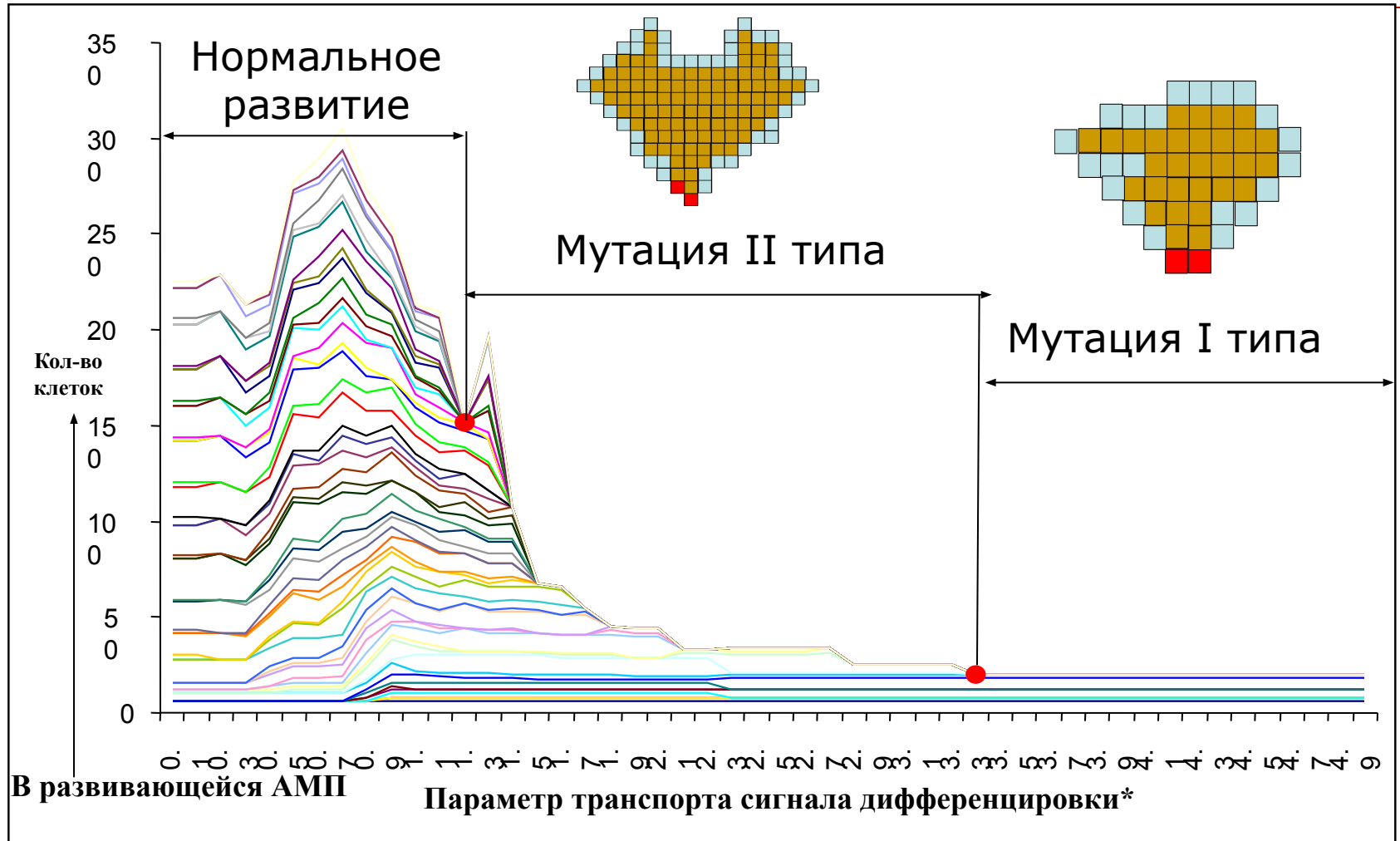


Влияние параметра синтеза SD (differentiation signal) на эволюцию клеточного автомата (* - значения параметра в относительных единицах)

Новосибирск, 2008



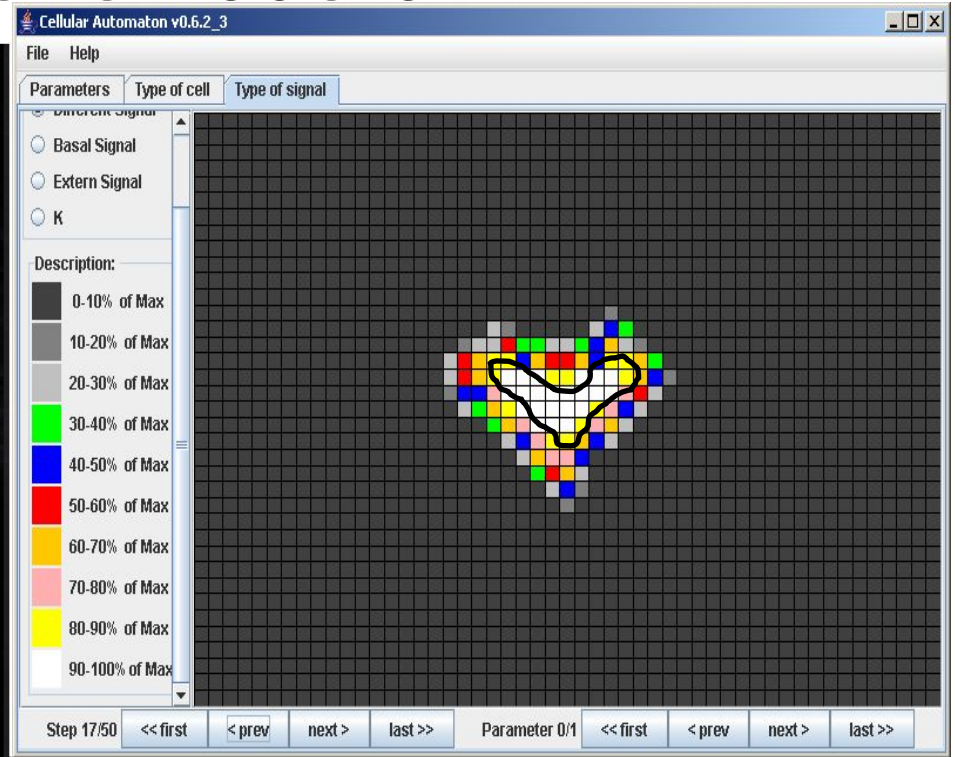
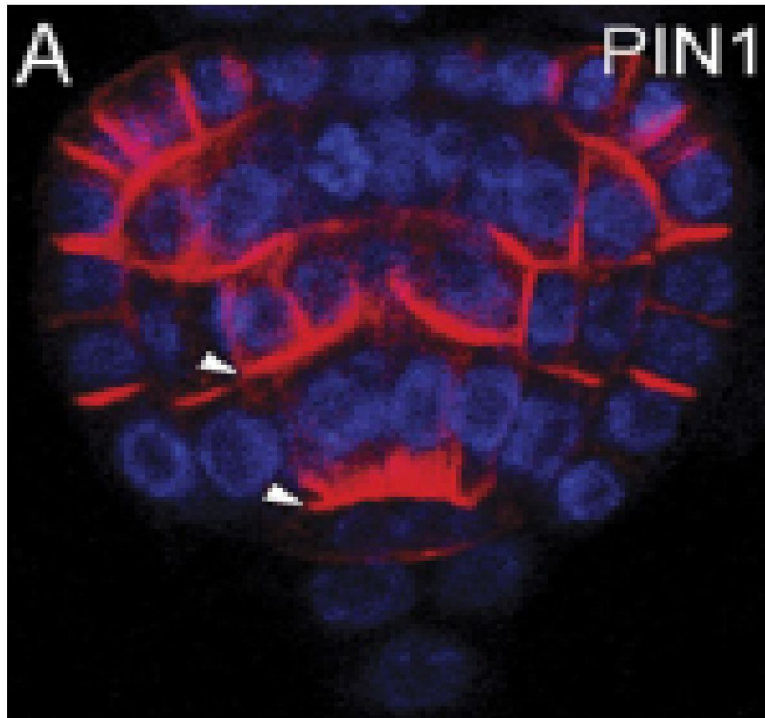
Анализ чувствительности модели к параметрам транспорта и синтеза SD (сигнала дифференцировки):



Влияние параметра транспорта SD (differentiation signal) на эволюцию клеточного автомата (* - значения параметра в относительных единицах). Новосибирск, 2008



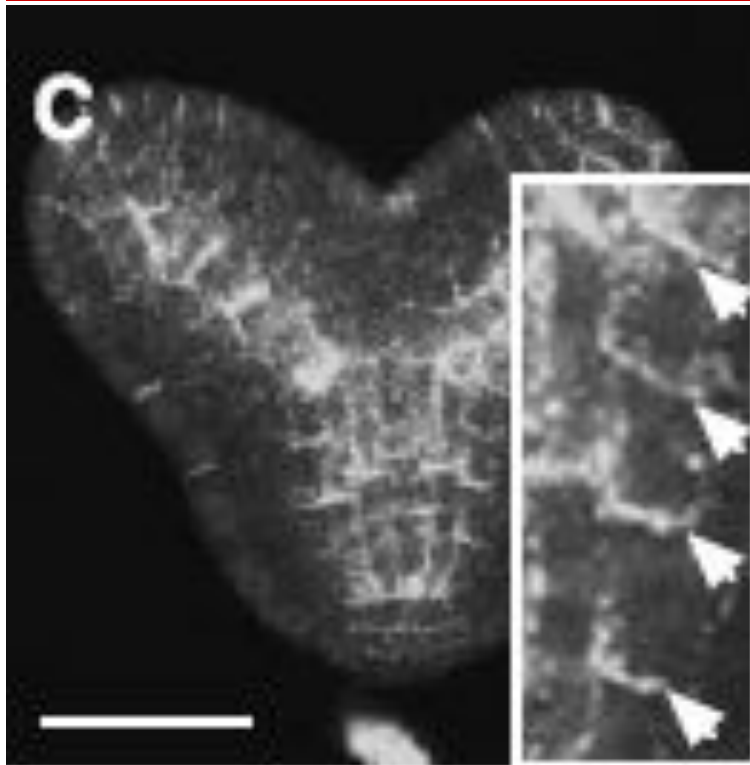
Распределение паттернов ауксина в развивающейся апикальной меристеме побега:



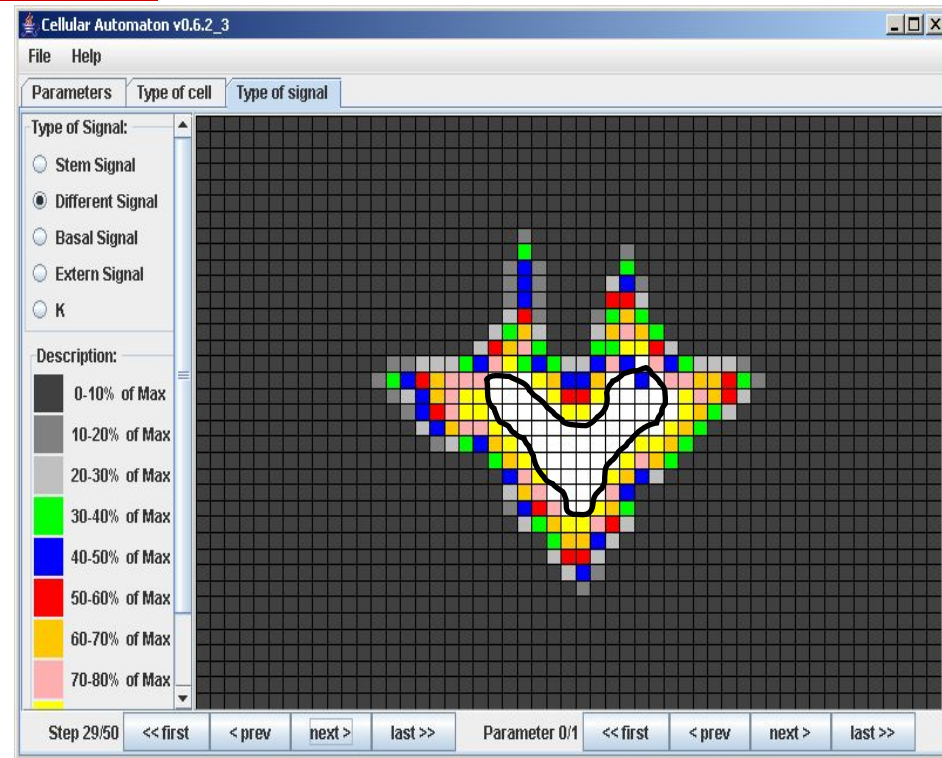
Иммунная локализация белков PIN1 в эмбрионе: окрашена полярное расположение PIN1 в диком типе (Michniewicz M. et al., 2007)

Распределение относительного максимума ауксина, полученное с помощью модели

Распределение паттернов ауксина в развивающейся апикальной меристеме побега:



Полярная локализация белков PIN1
на более поздней стадии развития
(Steinmann T. et al., 1999)



Распределение относительного
максимума ауксина,
полученное с помощью модели



Выводы:

- Разработана конвейерная технология конструирования математических моделей генных сетей, включающая следующие этапы:
 - 1) автоматическая генерация базы моделей элементарных подсистем генной сети;
 - 2) реконструкции интегральной математической модели генной сети в компьютерной системе MGSmodeller.
- Реконструирована структурная модель генной сети метаболизма ауксина в клетке побега *Arabidopsis thaliana*. Генная сеть содержит 235 молекулярно-генетических подсистем, объединяющих 162 объекта: 62 гена, 56 мРНК и 44 белка. Все молекулярно-генетические процессы распределены по семи компартментам. Логический анализ модели генной сети показал, что она относится к типу систем, поддерживающих внутриклеточный гомеостаз, за счёт наличия в ней отрицательных обратных связей и множественности путей биосинтеза и конъюгации целевого продукта (ауксина). Данный вывод подтверждён численным анализом интегральной математической модели.



Выводы:

- Автоматически сгенерированная база математических моделей элементарных подсистем генной сети метаболизма ауксина дополнена моделями, описывающими подсистемы транспорта низкомолекулярных веществ между компартментами клетки. Для моделей элементарных подсистем и интегральной модели подобран оптимальный набор значений параметров, позволяющий адекватно воспроизводить экспериментальные данные, в том числе: стационарное состояние генной сети; процентное содержание в клетке свободной формы ауксина, его эстрифицированной и амидных форм (<1% и 4%, 95% от общего пула ауксина соответственно); наработку амидных форм ауксина в мутантах *Arabidopsis thaliana trp3-1* и *trp2-1*, имеющие нарушения в триптофан синтазах α и β .
- Компьютерный анализ математической модели показал, что независимо от начальных значений концентраций ауксина и продукта *GH3* транскриптов в заданном диапазоне относительных единиц концентрации, происходит быстрая активация ауксином наработки продукта *GH3* транскриптов, который ослабляет сигнал ауксина инактивацией ауксина через конъюгацию. Это свидетельствует о быстрых процессах молекулярно-генетической регуляции в ответ на изменение концентрации ауксина в клетке.



Выводы:

- Разработана пространственно-распределённая математическая модель развития меристемы побега *Arabidopsis thaliana*. Для пространственно-распределённой модели подобран оптимальный набор значений параметров, позволяющий адекватно воспроизводить экспериментальные данные, в том числе: пространственное распределение паттернов ауксина в процессе развития апикальной меристемы побега; режимы нормального и аномального развития меристемы, соответствующие таким фенотипам как дикий тип и мутантам *suc1 suc2* и *clv3-2*. Из модели предсказано отсутствие других фенотипических проявлений в развитии апикальной меристемы побега.
- Анализ модели показывает, что развитие меристемы побега *Arabidopsis thaliana* на ранних этапах достигается на основе взаимодействия минимального набора процессов: ненаправленной диффузии сигнала дифференцировки и анизотропной диффузии базального сигнала. Кроме того, развитие апикальной меристемы побега в основном определяется транспортом сигналов и в меньшей степени, их синтезом.



Благодарности:

-
- Лихошвай В.А.
 - Колчанов Н.А.
 - Омелянчук Н.А.
 - Миронова В.В.
 - Казанцев Ф.
 - Озонов Е.А.
 - Ефимов В.М.
 - Безматерных К.Д.
 - Мёлснесс Э.
-